Feel so Science キットシリーズ

#007 生物発光キット

取扱説明書

ver.6.0

1-100-007

目次

本キットの特徴

本キットは、生物発光として有名なホタル腹部の発光現象を試験管内で再現する実験キットです。

酵素として働くタンパク質ルシフェラーゼに基質であるルシフェリンおよびATPを添加することでホタルの腹部の発光を再現します。

さまざまな温度、pH 条件で発光の強弱を比較することにより、生物発光の仕組みだけでなく、生体内での酵素が働くための最適な条件について学習することが可能です。

ホタルの光の材料

1．光のもと
（ルシフェリン）

2．エネルギー（ＡＴＰ）

3．タンパク質
ルシフェラーゼ

キット使用時に必要な試薬機材の一覧

キット内容 【生徒 20 名分】

・生物発光試薬（A 粉末, B 粉末）	各 1 袋
・分注用チューブ	40 本
・粉末溶解用チューブ	2 本
・スポイト	2 本

本キット以外に必要な試薬・機材一覧

・蒸留水（水道水も可）	100 mL
・分注用ピペット	数本

温度条件変化実験を行う場合

・お湯（65～70℃）	チューブが浸る程度
・氷水	チューブが浸る程度

pH 条件変化実験を行う場合

・HCl 溶液	数 mL
・NaOH 溶液	数 mL

内容物

①A 粉末

酵素ルシフェラーゼを含みます。蒸留水に溶解してご使用ください。粉末の状態で、冷蔵保存の場合 **3** ヶ月の保存が可能です。酵素は失活しやすいため、一度蒸留水に溶解した後はその日のうちにご使用ください。

②B 粉末

基質ルシフェリンおよび ATP を含みます。蒸留水に溶解してご使用ください。保存期間等は A 粉末と同じです。

③取り扱い説明書

本書となります。生物発光キットの使用方法、発光原理などを説明しています。

④分注用チューブのフタ

A 溶液、B 溶液それぞれを分注した分注用チューブ（⑤）で A,B 溶液を混合する際に使用します。チューブを上下させて、溶液を均一に混ぜることができます。

⑤分注用チューブ

A 粉末、B 粉末の溶液を分注する目的で使用します。1 mL 程度の溶液を A 粉末溶解水（A 液）・B 粉末溶解水（B 液）別々に分注してください。

⑥粉末溶解用チューブ（**50 mL**）

A、B の粉末を溶解する際に使用してください。

⑦スポイト

A 粉末水溶液（A 液）、B 粉末水溶液（B 液）を分注する際に使用してください。A 液用、B 液用それぞれでスポイトを使い分けてください。分注の段階で A 液と B 液が混ざらないように気をつけてください。

事前準備

班構成

本実験キットでは 20 名が1人ずつ実験を行うことを推奨します。

機材 1 人分

A 液（1 mL）　　　　　　　1 本
B 液（1 mL）　　　　　　　1 本
※実験手順の項に従って試薬を溶解してください。

以下の手順に従って試薬を溶解，分注してください。

1）A 粉末、B 粉末をそれぞれ 50 mL の水に溶かす。
2）溶液を 1 mL ずつ、分注チューブに分注する。
3）実験室を暗闇にできるよう、目張り等をします。

※遮光カーテン、暗幕などで十分に実験室を暗くできない場合には、霧吹きで窓へ水をかけてからアルミホイルを張り付けることで遮光することが可能です。実験後は、簡単にアルミホイルを外すことが可能です。

実験手順

1）B 液のチューブの口を A 液のチューブの口に付け、チューブを傾けながら少しずつ B 液を A 液に入れる。
2）暗闇の中で観察する。
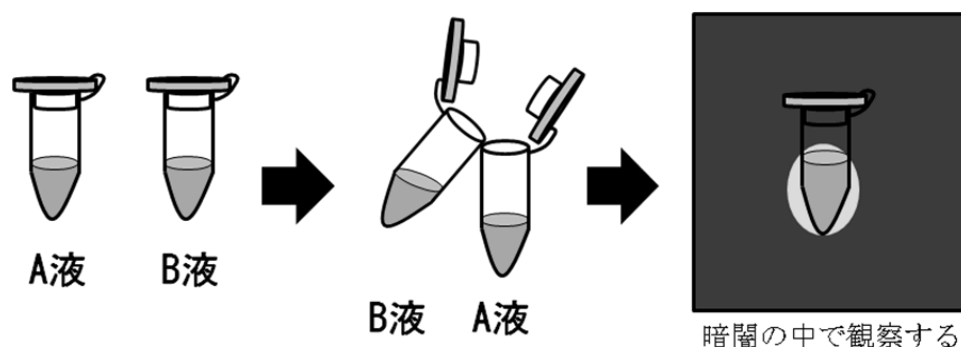
図1. 試薬を混ぜて発光の様子を観察

※温度を変化させる、pH を変化させるなどして、酵素の至適条件を検討する実験をするなど、さまざまな工夫が可能です。

温度条件変化実験を行う場合

温度変化実験を行う場合は、1 人 2 セットずつ A 液、B 液が必要になります。

65～70℃のお湯と氷を用意し、以下のように反応条件を変化させ、光の変化を観察します。

1. 反応溶液をお湯につけ、光の様子を観察する。
   （少しずつ光が弱くなり、消える）
2. 1. で温めた溶液を室温に戻し、光の様子を観察する。
   （光らない）
3. 新しい反応溶液を作り、氷水で冷やし、光の様子を観察する。
   （少しずつ光が弱くなり、消える）
4. 3. で冷やした溶液を室温に戻し、光の様子を観察する。
   （光る）
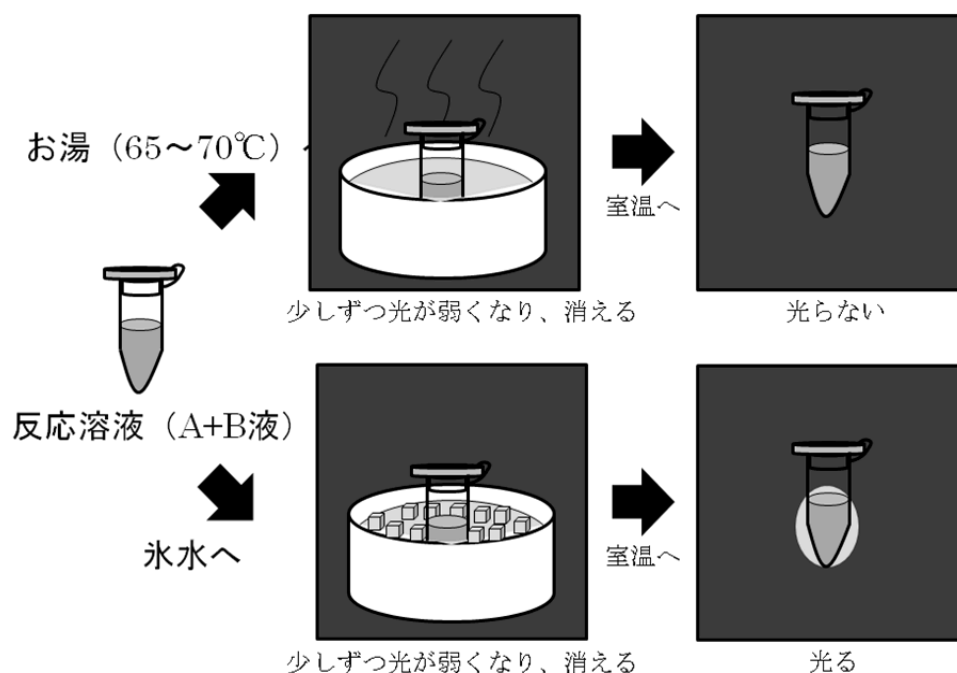
図2. 温度条件を変えて発光の様子を観察

pH 条件変化実験を行う場合

HCl 溶液または NaOH 溶液を少しずつ加えながら光の変化を観察した後、中和して再度光を観察します。

※HCl 溶液は、レモン水、NaOH 溶液は石鹸水で代用することが可能です。
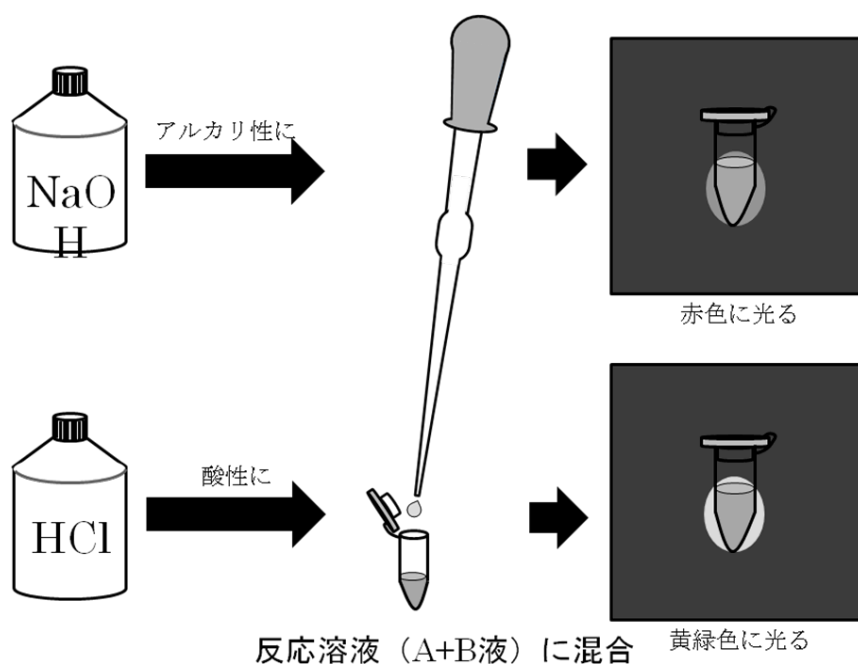
図3. pH 条件を変えて発光の様子を観察

指導のポイント

1)　完全に部屋を暗くする前に、A 液、B 液のチューブの口を近づけさせ、暗闇でも混ぜられるように用意させて下さい。

2)　酵素溶液は、室温で放置すると失活します。蒸留水に溶解した後は実験直前まで冷蔵庫、もしくは氷上で保管して下さい。

3)　温度実験を行う際は、やけどに注意してください。

4)　試薬は手で触ることも可能です、手のひらの上に発光液を乗せたり、紙に染み込ませて光を観察することができます。（実験後はよく手を洗ってください）

5)　目や口に入った場合は水でよくすすぎ、気分が悪くなった場合は医師に相談してください。

片付け

1) 余った試薬類は、普通ゴミとして廃棄可能です。

2) 使用したチューブはそのまま廃棄するとゴミ袋が破れてしまう可能性があるので、2 重にした小さな袋などにまとめて、プラスチックゴミとして廃棄して下さい。

付録 1　ホタルの発光について

ホタルの発光現象

　ホタルの光を見たことがありますか？ホタルは繁殖期である初夏に最も強く光ります。ホタルの光は求愛のコミュニケーション信号と言われ、光りながら飛び回っているオスは草むらにいるメスから光の信号を受けると一直線に降りていきます。この様子からホタルは「火垂」と書かれるようになりました。

　ホタルの発光器は、腹部にあります。この部分に発光細胞があり、さらにその細胞の中で、化学反応による発光現象が起きているのです。この反応では、熱を出さずに発光するため、この光を「冷光」とよんでいます。

　ホタルの光り方は種によって異なりますが、同じ種のホタルでも、生息域によって違いがあります。例えばゲンジボタルは、西日本では約 2 秒に1回、東日本では約 4 秒に 1 回光ることが知られています。

発光と酵素反応

　ホタルは、ルシフェリン（発光物質）とルシフェラーゼ（酵素）を ATP と Mg^{2+}, O^{2-}存在下で反応させることで発光しています。ルシフェラーゼは、ホタルなどの発光生物がもつ酸化酵素の一種です。基質であるルシフェリンを、ATP と結合させて酸化する反応を触媒します。ルシフェリンはこの反応を経てオキシルシフェリンとなり、分子中の酸素が励起し、励起一重項とよばれる状態になります。この状態から基底状態へ戻るときに、光を発します（付録 3 参考）。これがホタルの発光の原理です。

付録 2　酵素の触媒作用

酵素には、化学反応を促進する触媒作用があります。これは化学物質による触媒反応と区別し、生体触媒と呼ばれています。それでは触媒作用とは一体どのような働きなのでしょうか。

生命活動を維持するために、生体内ではさまざまな化学反応が起きています。胃腸での食物の分解反応などもその1つです。

例えば、食物は放置しただけでは分解されません。食物の分解という化学反応を起こすためには、相応のエネルギー（活性化エネルギー）が必要なのです。触媒は、このエネルギー量を減らし、反応を起こしやすくする働きがあるのです。このように、食物は胃腸に入ると消化酵素（触媒）の働きにより分解されます。
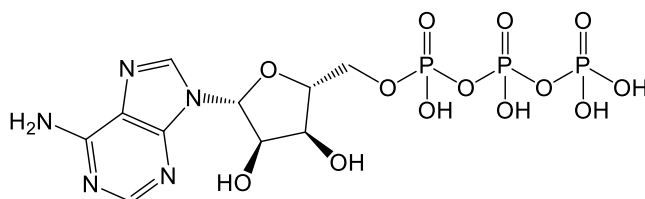
図 4. **ATP** (**A**denosine **Tri**phosphate)の化学構造

酵素の実体

触媒の機能は、通常、温度を上げると、それに比例して触媒能が上がります。しかし、酵素は無機触媒とは異なり、ある温度以上になるとその活性が失われます。これは、酵素の主成分がタンパク質だからなのです。

タンパク質は熱に弱い物質です。例えば、生卵は熱を加えると固まりますし、牛乳は煮沸するとタンパク質が固まり、表面に薄い膜を形成します。これらは、タンパク質の形が変わった（変性）ために起こる現象なのです。酵素も、タンパク質が主成分であることから、熱を加えすぎると形が変化し、その機能を失ってしまうのです。

また、タンパク質は酸・アルカリによっても変化するため、酵素活性は pH にも依存します。

付録 3 ルシフェリンールシフェラーゼ反応

ホタルルシフェリン

ATP

Mg^{2+}/ルシフェラーゼ

ルシフェリンーAMP

+ P-P

O_2/ルシフェラーゼ

ペルオキシドアニオン

ジオキセタン誘導体
(基底状態)

+ HOAMP

$-CO_2$

オキシルルシフェリン
(基底状態)

光 + 分解物(基底状態)
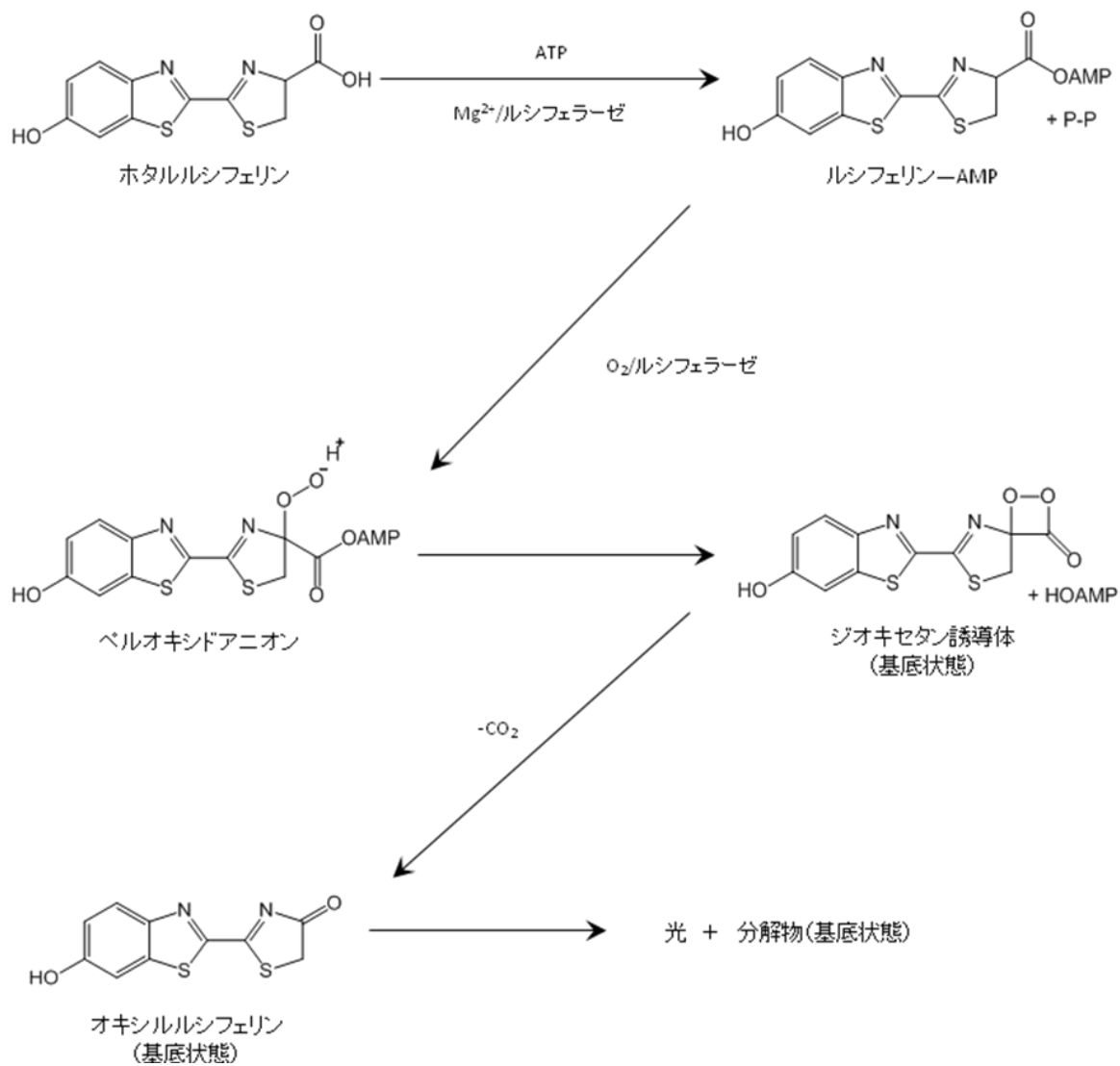
図 5. ルシフェリンールシフェラーゼ反応

参考文献:池田圭一、武位教子、加藤薫「光る生き物」株式会社技術評論社

付録 4　授業用ワークシート

研究ノート

温度処理実験

	予想	結果（処理中）	結果（処理後）	考察
お湯へ				
氷水へ				

pH処理実験

	予想	結果（処理中）	結果（処理後）	考察
NaOH				
HCl				

免責事項

本製品は、教育を目的として開発されたキットです。本取扱説明書に記載された手順以外でのご使用につき発生したいかなる損害に関して、当社は一切の責任を負いません。

商品のご返品について

商品のご返品につきましては、弊社の確認を必要とさせていただきます。この確認なしでのご返品はご遠慮ください。適切な保存、ご使用をされていない製品についてはご返品をお受けできない場合がございます。また、品質保持のために返品された製品を再販することは一切ございません。

アフターサポート 「バイオレスキュー」

ご購入後 3 ヶ月間(ご購入月を含む)無料でご利用いただける、アフターサポートサービスです。大学や研究機関等で研究に携わる、若手研究者が実験手順や先端科学に関する知識面のサポートをいたします。

サポートを担当するのは、リバネスが実施する先端科学実験教室のノウハウを持つスタッフでもありますので、授業内で行う実験カリキュラム等に関するご相談も承っております。気軽にご利用いただけるサービスですので、少しでもご不明な点がございましたらぜひご利用下さい。

Feel so Science シリーズ　カスタマーサポート係

TEL：03-6277-8041

FAX：03-6277-8042

Mail：ed-kit@leaveanest.com

※FAX をご利用の場合は、同封の FAX 用紙にご記入の上ご送信ください。

製造・販売元

お問い合せ先

〒160-0004
東京都新宿区四谷 2-11-6 VARCA 四谷 10F
TEL 03-6277-8041
FAX 03-6277-8042
URL：http://www.leaveanest.com/